

PRENOS ŠALOTKE V TKIVNO KULTURO S PREGLEDOM ZDRAVSTVENEGA STANJA ČEBULIC PRI SORTI POHORKA

Julija POLANŠEK¹, Lucija LUSKAR², Darko VERNIK³,
Irena MAVRIČ PLEŠKO⁴ in Andreja ČERENAK⁵

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 4. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 5. 12. 2022

Izvleček

Slovenske sorte semenskega česna in šalotke so močno okužene z virusi, kar posledično vodi k zmanjšanim količinam pridelka. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) smo se celotnega *in vitro* postopka vzgoje šalotke (*Allium cepa* var. *Aggregatum* G. Don.) slovenske sorte Pohorka lotili na podlagi že znanih uspešnih praks *in vitro* vzgoje česna na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS). Šalotke so bile testirane na prisotnost virusov s serološkimi (ELISA) in v primeru nejasnih rezultatov dodatno še z molekularnimi metodami (RT-PCR). Rezultati testiranja na prisotnost virusov so na večini analiziranih vzorcev potrdili prisotnost latentnega virusa šalotke – SLV (shallow latent virus). Semenski material je bil predhodno okužen z glivo *Aspergillus niger* Tiegh. Dodatek fungicida Luna® Experience osnovnemu gojišču se je izkazal za najučinkovitejši postopek zatrtja prisotne glive v *in vitro* razmerah. Avtohtono slovensko sorto Pohorka smo uspešno prenesli v *in vitro* razmere in jo ohranjamo na gojišču Gamborg B5 z dodanimi avksini in jasmonsko kislino ter na MS gojišču za debeljenje čebulic. V nadaljevanju bo delo osredotočeno na eliminacijo SLV iz semenskega materiala sorte Pohorka.

Ključne besede: šalotka, tkivne kulture, virusi, SLV

SHALLOT TRANSFER INTO TISSUE CULTURE WITH AN EXAMINATION OF BULBS' HEALTH CONDITION OF VARIETY POHORKA

Abstract

Slovenian varieties of garlic and shallot that are produced for seeds are heavily infected with viruses which lead to a consequent reduction in yields. At the

¹ Mag. inž. hort., Kmetijski inštitut Slovenije (KIS), e-naslov: julija.polansek@kis.si

² Mag. biotehnol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: lucija.luskar@ihps.si

³ KIS, Selekcijsko poskusni center Ptuj, e-naslov: darko.vernik@kis.si

⁴ Dr., KIS, e-naslov: irena.mavricplesko@kis.si

⁵ Izr. prof. dr., IHPS, e-naslov: andreja.cerenak@ihps.si

Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS), the entire process of *in vitro* cultivation of shallot (*Allium cepa* var. *Aggregatum* G. Don.) of the Slovenian variety Pohorka was undertaken based on already known successful practices of *in vitro* cultivation of garlic at the Agricultural Institute of Slovenia (KIS). The shallot was serologically (ELISA) tested for the presence of viruses and, in case of unclear results, additionally by molecular methods (RT-PCR) for more accurate detection. The results of tests for the presence of viruses confirmed the presence of only shallot latent virus - SLV in most of the analyzed samples. The material was previously also infected with the fungus *Aspergillus niger* Tiegh. The addition of the fungicide Luna® Experience into the base medium proved to be the most effective method to inhibit the fungus *in vitro*. The autochthonous Slovenian variety Pohorka was successfully transferred to *in vitro* conditions and is maintained on Gamborg B5 medium with added auxins and jasmonic acid and on MS medium for bulbs to swell. Following, the research will be focused on the elimination of SLV from the seed material of the variety Pohorka.

Keywords: shallot, tissue cultures, viruses, SLV

1 UVOD

Šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don.) spada med čebulnice, kamor sodijo tudi čebula, česen, por, zimski luk, drobnjak in druge (Černe, 1992). Od čebule se loči po načinu rasti, saj oblikuje večje število manjših čebulic in po okusu, ki je pri šalotki milejši (Swamy in Veere Gowda, 2006). Rastline iz rodu lukov (*Allium*), ki ga uvrščamo v družino lukovk (Alliaceae), so pogosto okužene z virusi. Velik problem pa virusne okužbe predstavljajo predvsem pri česnu in šalotki, saj njuno razmnoževanje poteka izključno vegetativno, kar pa vodi v kopičenje virusov v sadilnem materialu (Katis in sod., 2012). Virusi, ki okužujejo te rastline povzročajo izgube in slabšanje kakovosti pridelka (Cafrune in sod., 2006; Conci in sod., 2003; Lunello in sod., 2007). Slovenska semenarska pridelava česna in šalotke se sooča z izjemno okuženostjo semenskega materiala slovenskih sort, kar ima za posledico tudi zmanjšane količine pridelka. Najpogosteje zastopani virusi na česnu in šalotki so virus rumenenja in pritlikavosti čebule (OYDV, rod *Potyvirus*), virus rumene črtavosti pora (LYSV, rod *Potyvirus*), navadni latentni virus česna (GarCLV, rod *Carlavirus*), latentni virus šalotke (SLV, rod *Carlavirus*), virus česna A (GarV-A, rod *Allexivirus*), virus česna B (GarV-B, rod *Allexivirus*), virus česna C (GarV-C, rod *Allexivirus*), virus X šalotke (ShVX rod *Allexivirus*) (Perotto in sod., 2010; Vršiček Marn in sod., 2017a; Vršiček Marn in Mavrič Pleško, 2017). Zaradi razširjenosti in škode, ki jo povzročajo virusi, sta gospodarsko najpomembnejša virusa na čebulnicah virusa iz rodu *Potyvirus*, to sta OYDV in LYSV (Katis in sod., 2012). Pri česnu se lahko v primeru okužbe z LYSV pridelek zmanjša za 54 % ter tudi do 69 % pri okužbi z OYDV (Perotto in sod., 2010). Viruse iz rodov *Potyvirus* in *Carlavirus* prenašajo listne uši, kar lahko vodi v hitro širjenje okužbe. Latentni

virus šalotke (SLV) na rastlinah ob okužbi ne povzroča vidnih simptomov. V kolikor je na rastlini prisoten še kateri od potivirusov pa v sinergiji lahko povzročita znatne izgube pridelka (Sako, 1989). V rod *Carlavirus* uvrščamo tudi GarCLV, ki pa se na šalotki ne pojavlja pogosto. Brez očitnih simptomov se na šalotki pojavljata še ShVX in s pršicami prenosljivi latentni virus šalotke (SMbLV). Uvrščamo ju med aleksiviruse, katerih prenašalke so pršice šiškarice. V primeru hkratne okužbe z virusi iz ostalih rodov, prav tako prihaja do medsebojnih sinergističnih učinkov in znatnih izgub pridelka (Katis in sod., 2012). Rastline brez virusov, pridobljene s kombinacijo termoterapije in krioterapije, so pokazale izboljšanje vegetativne rasti in pridelek čebulic (Wang in sod., 2021).

Z namenom izboljšanja zdravstvenega stanja semenskega materiala slovenskih sort čebulnic smo z EIP projektom ciljali na vzpostavitev vzdrževalne selekcije čebulnic za pridelavo zdravega semenskega materiala slovenskih sort česna in šalotke. V tkivne kulture smo prenesli avtohtono sorto Pohorka ter testirali obstoječ sadilni material na prisotnost različnih virusov. S tako imenovano brezvirusno semensko šalotko bi poskrbeli za povečanje pridelka pri pridelovalcih zelenjave. Sočasno bi s tem tudi pripomogli k ohranjanju avtohtone slovenske sorte šalotke, ki zaradi slabše donosnosti v pridelavi izginja. Z raziskavami vezanimi na šalotko smo se osredotočili na sorto Pohorka, ki je od leta 2019 edina vpisana v Sortni listi RS (FURS, 2022) in za katero vzdrževalec sorte navaja, da je prijetno aromatična, z odlično kulinarično lastnostjo in dobro skladiščno sposobnostjo.

2 MATERIAL IN METODE DELA

2.1 Rastlinski material in sterilizacija

Za vzpostavitev metode prenosa šalotke v tkivno kulturo smo uporabili komercialne sorte, ki so prosto dostopne na tržišču. Preliminarno smo v *in vitro* razmere najprej prenesli semenski material treh različnih sort šalotke (Golden gourmet (dva različna dobavitelja), Red sun in Pohorka). Sledila je usmerjena *in vitro* vzgoja edine slovenske sorte šalotke – Pohorka za namen vzgoje brezvirusnega slovenskega sadilnega materiala Rastlinski material te sorte je zagotovil Seleksijsko-poskusni center Ptuj.

Predhodno smo odbrali najvitalnejše rastline sorte Pohorka, gojene v zemlji (na njivi ali v rastlinjaku), jih označili (zagotovljen sistem sledljivosti) in prenesli v laboratorij. Pred začetkom vnosa rastlinskega materiala v tkivne kulture je bila potrebna sterilizacija tkiva. Celotno gnezdo smo olupili in ločili na posamezne čebulice. Čebulicam smo porezali odmrle dele in porjaveli koreninski del. Z detergentom in ščetko smo jih dobro očistili pod tekočo vodo. Zgornji del smo s skalpelom odrezali, ustrezno označili in zapakirali. Ta del smo uporabili za testiranje na viruse, ki je potekalo na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS). Med rezjo

posameznih vzorcev smo skalpel razkužili. Spodnji – bazalni del smo uporabili za nadaljnje delo v tkivni kulturi.

Priprava *in vitro* kulture je potekala po modificiranem protokolu Vršiček Marn in sodelavcev (2017). Pripravili smo magnetno mešalo, nanj postavili čaši s pripravljenim razkužilom. Za postopek razkuževanja smo pripravili 70 % raztopino etanola in 5 % raztopino dehidriranega natrijevega dikloroizocianurata (DICA), slednji smo dodali dve kapljici močila (Tween®). Bazalne plošče smo razkuževali 20 sekund v etanolu. Sledil je prenos v čašo s 5 % raztopino DICA za 15 minut. Po končanem razkuževanju smo jih prenesli v predhodno z UV lučko dezinficiran laminarij in jih trikrat sprali v sterilizirani destilirani vodi (SDW) (Hidayat, 2005).

2.2 Gojenje v *in vitro* razmerah

Posamezno bazalno ploščo smo po spiranju s SDW položili na sterilni filter papir. S pomočjo skalpela in pincete smo odstranili odvečno, porjavelo ali od razkuževanja požgano tkivo. Večje bazalne plošče smo razpolovili, manjše (velikosti cca 3 mm) pa pustili cele. Pravilno orientirane (spodaj del, iz katerega so izraščale koreninice) smo prenesli na gojišče. 1 liter osnovnega gojišča je vseboval 8 g/l agarja, 30 g/l saharoze, 3,16 g/l Gamborg B5 medija, 10 ml/l raztopljenе indol-3-propanojske kisline (iPA) hormona (5 mg / 50 ml destilirane vode) in 50 µL/l jasmonske kisline, pH = 5.

Epruvete z bazalnimi deli šalotk smo ustrezno označili in v stojalnih postavili v rastno komoro. Dnevna temperatura v rastni komori je bila 22 °C, nočna pa 20 °C. Dolžina dneva je znašala 16 ur. Po enem tednu smo preverili uspešnost sterilizacije. Vse epruvete z vidnimi okužbami smo redno odstranjevali.

Zaradi velikega izpada rastlin v *in vitro* pogojih v prvih serijah prenosa (okužbe rastlin z glivo *Aspergillus niger* Tiegh.) smo pri nadaljnjem delu osnovnemu gojišču po avtoklaviranju dodali 2 ml/l fungicida Luna® Experience (0,2 % koncentracija), ki se je izkazal za učinkovitega pri zatiranju okužbe.

Prvi zeleni poganjki so začeli izraščati približno po dveh tednih. Ko so bili dovolj veliki in imeli formirano čebulico, smo jih ločili in prestavili v posamezne epruvete z gojiščem za debeljenje čebulic, ki je vsebovalo 80 g/l saharoze, 8 g/l agarja in 4,43 g/l medija Murashige in Skoog (MS), pH umerjen na 5,9–6,0.

2.3 Določanje virusnih okužb

Vse rastline so bile ob vnosu v *in vitro* razmere testirane na prisotnost OYDV, LYSV, GarCLV, SLV, GarV-A, GarV-B, GarV-C in ShVX s serološko metodo ELISA (Perotto in sod., 2010; Vršiček Marn in sod., 2017a; Vršiček Marn in Mavrič

Pleško, 2017). Analize so bile opravljene s protitelesi proizvajalca DSMZ po njihovem protokolu. V primeru nejasnih rezultatov seroloških analiz smo opravili še testiranje z RT-PCR. Skupno RNA smo izolirali iz 10 mg tkiva s kitom MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo) po navodilih proizvajalca, 1,5 µl izolirane RNA pa smo uporabili v RT-PCR reakciji s kitom Qiagen One step RT-PCR kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Za testiranje OYDV smo uporabili začetna oligonukleotida CRCCARTTGGATAAYGC/ YTCCGTGTCCTCWTCCG prilagojena v okviru te naloge, za SLV pa CTTTTGGTTCACTTTAGG/GCACGCAATAGTCTACGG (Mituti in sod., 2011).

2.4 Termoterapija

Za postopek termoterapije smo uporabili najvitalnejše rastline, odgnane iz bazalnih plošč. Ko so imele rastline vsaj 4–5 cm dolg vitalni glavni poganjek in dobro razvit koreninski sistem, je sledila termoterapija. Rastline so bile najprej en teden izpostavljene temperaturi 30 °C in nato še 5 tednov 37 °C (Walkey in sod., 1987). 8 od 12 rastlin je termoterapijo uspešno preživelo. Dolžina dneva v rastni komori je znašala 16 ur, s 65 % zračno vlago.

2.5 Izolacija meristemov

Predhodno smo si pripravili gojišče za meristeme. 1 liter gojišča za izolacijo meristemov je vseboval 3,2 g/l Salt and Hildebrandt Basal Salt Mixture, 30 g/l saharoze, 7,5 g/l agarja, 5 ml/l hormonske raztopine 1- naftalen oetne kisline (NAA) in 20 ml/l hormonske raztopine 6- γ , γ -dimetilalilamin purin (2iP), pH vrednost gojišča 5,9 – 6,0. Postopek smo izvedli pod sterilnimi pogoji. Preživele šalotke smo v laminariju prestavili iz epruvete in pod stereolupo s pomočjo koničastih igel pridobili meristem ter ga v sterilnih pogojih prestavili na navedeno gojišče.

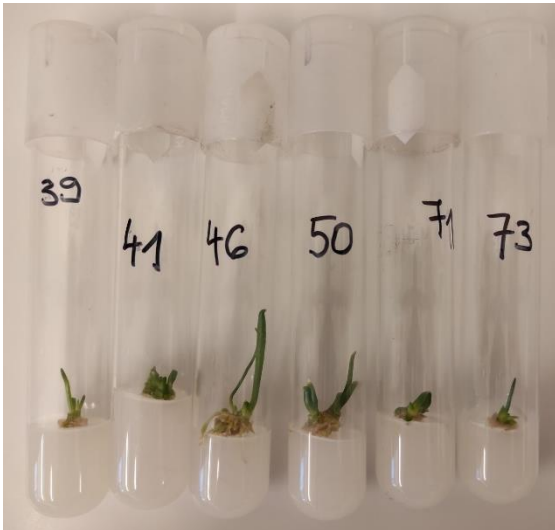
3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Skupno je bilo do sedaj v tkivne kulture preneseno tkivo 102 šalotk (spodnji del posamezne čebulice), ki so bile vse testiranje tudi na prisotnost virusov (zgornji del posamezne čebulice). Med 102 čebulicami, je bila s serološko metodo okužba s SLV potrjena pri 92 čebulicah, 10 čebulic (9,8 %) je bilo brez prisotnosti analiziranih virusov. Smékalová in sod. (2017) poročajo o 93,4% okuženosti šalotke s SLV naključno testiranih zelenih listov šalotk z ELISA testi. Preostali del čebulic iz gnezda teh desetih zdravih čebulic smo prihranili, jih posadili v lončke in gojili v rastlinjaku (Slika 1). Sklepali smo, da je okuženost znotraj gnezda enaka. Ko so rastline odgnale in bile dovolj razvite za vzorčenje, smo zeleno maso vzorčili in testirali na prisotnost virusov z ELISA testi. V devetih vzorcih smo s serološkimi testi ugotovili prisotnost SLV, pri treh čebulicah iz istega gnezda pa smo potrdili tudi prisotnost OYDV (preglednica 1). Pri nekaj vzorcih smo na osnovi seroloških testov

sumili na okužb s SLV oziroma OYDV. Za gotovo potrditev virusov je sledilo še RT-PCR testiranje teh istih vzorcev. Okužbo enega vzorca s SLV smo potrdili, medtem ko okužbe z OYDV nismo potrdili.

Preglednica 1: Rezultati ELISA testiranj na prisotnost virusov pri 10 čebulicah šalotke po sajenju v rastlinjaku (razvita zelena listna masa).

Oznaka vzorca	OYDV	LYSV	GarCLV	SLV	GarV-A	GarV-B	GarV-C	ShVX
47/1	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
47/2	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
79/1	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
79/2	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
90	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
94	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96/1	poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96/2	poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96/3	poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
99	neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.



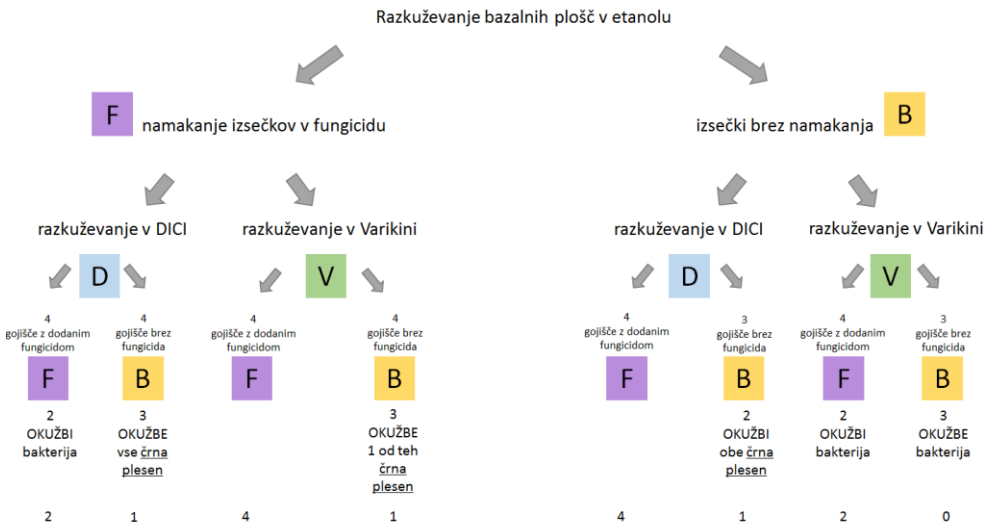
Slika 1: Levo odgnani izsečki šalotke sorte Pohorka v tkivni kulturi in desno presajene čebulice v substrat.

Sklepamo lahko, da je bila koncentracija virusov (predvsem SLV) pod mejo detekcije za ELISA test na prvem testiranju, ko se je testiralo zgornji del posamezne čebulice. Kasneje je sledilo ELISA in RT-PCR testiranje listov, odgnanih iz čebulic iz istega gnezda. Lahko, da je bil SLV prisoten tudi v predhodnih vzorcih, ki so izhajali iz iste serije glavic, a je bila njegova koncentracije pod mejo zaznave, z razvojem in rastjo rastlinic pa se je virus namnožil. Naši rezultati se skladajo s hipotezo, da koncentracija SLV z rastjo šalotke narašča. O višjih koncentracijah SLV v starejših listih so poročali Pauzi in sod. (2018), medtem ko je bila v šalotki za seme oz. Mlajših rastlinah koncentracija SLV nižja. Koncentracija je bistveno narastla že po 14 dneh od sajenja šalotke (Pauzi in sod., 2018).

Za razliko od predhodnega ELISA testiranja smo tokrat pri posameznih vzorcih poleg SLV zaznali tudi prisotnost OYDV, ki ga prej nismo zaznali. Po ponovnem testiranju razvitih zelenih delov, tokrat z RT-PCR smo okužbo z OYDV potrdili le pri vzorcih z oznako 96/1, 96/2 in 96/3, tudi v kasnejši fazi rasti. Vsi trije posajeni vzorci oz. Čebulice so izhajale iz istega gnezda. Podobno kot pri SLV je možno, da je bil OYDV prisoten tudi v začetnih vzorcih (ko smo testirali zgornji del čebulic), saj so izhajale iz istega gnezda, a je bila njegova koncentracije pod mejo zaznave, z razvojem in rastjo rastlinic pa se je virus namnožil. Možno pa je tudi, da je bil virus med čebulicami v gnezdu neenakomerno razporejen. Vršiček Marn in sod. (2017b) so poročali, da je na podlagi njihovih raziskav za zgodnejšo detekcijo OYDV, GarCLV in LYSV v tkivni kulturi primernejša uporaba molekularnih metod, saj so občutljivejše od seroloških. Prisotnost OYDV na šalotki lahko privede do večjih izgub pridelka (Katis in sod., 2012). Okužba s SLV ne predstavlja nevarnosti za sam pridelek, tudi simptomi pri okužbi niso izraženi. Problem predstavlja sočasna okužba z virusi iz rodu *Potyvirus*, saj se v tem primeru zaradi sinergističnega delovanja simptomi močneje izrazijo in lahko povzročijo veliko škodo na pridelku (Sako, 1989). Šalotka, okužena z obema virusoma, SLV in OYDV torej lahko predstavljajo resnejši problem za pridelavo. Pauzi in sod. (2015) so poročali, da je kombinacija okužbe s SLV in potivirusom na šalotki v Indoneziji dosegla 92,9 % okuženost pridelka v poljskih razmerah. Pri testiranih šalotkah v poskusu Smékalove in sod. (2017) so v 53,2 % primerkih potrdili okužbo z OYDV in v 59,9 % okužbo z LYSV. Okužene čebulice oz. Okužen sadilni material predstavlja glavni vir okužb na poljih (Pauzi in sod., 2018). Za uspešno eliminacijo virusov se je kombinacija kulture meristemov, termoterapije in kemoterapije izkazala za najučinkovitejšo za pridobitev brezvirusnega sadilnega materiala (Manjunathagowda in sod., 2017).

Zaradi okužbe rastlinskega materiala z glivo *Aspergillus niger* je prišlo do 100% izpada rastlin v *in vitro* pogojih v prvih serijah prenosa. Zatiranja glive smo se lotili z različnimi tehnikami, pripravili smo dve različni gojišči (Slika 2) – osnovno gojišče in enako gojišče, ki smo mu po avtoklaviranju dodali fungicid Luna® Experience. Sledilo je razkuževanje rastlinskega materiala. Osnova je ostala razkuževanje v 70 % etanolu. Nato smo polovico vzorcev namakali v 0,3 % fungicidu, polovice vzorcev

pa v fungicidu nismo predhodno namakali. Sledilo je razkuževanje v 5 % DICA oziroma nekaj izsečkov v 25 % Varikini®. V primeru razkuževanja z Varikino® je tkivo šalotke precej porumenelo in propadlo, ta metoda razkuževanja je bila za izsečke preveč intenzivna. Za najučinkovitejšo metodo se je izkazalo razkuževanje v etanolu, brez dodatnega namakanja v fungicidu. Razkuževanje z DICA in nanos rastlinskega materiala na gojišče z dodanim fungicidom pa se je izkazalo za učinkovito metodo pri zatiranju okužbe.



Slika 2: Shematski prikaz postopka razkuževanja rastlinskega materiala za preprečitev okužbe izsečkov s črno plesnijo (*Aspergillus niger*).

Na podlagi poskusov z dodajanjem različnih koncentracij fungicida (0,2 %, 0,3 % in 0,5 % koncentracije) osnovnemu gojišču smo ugotovili, da zadostuje že najnižja priporočena koncentracija, torej 0,2 %. Subkultivacija izsečkov na gojišče brez fungicida lahko sledi že po enem tednu v izogib morebitnim vplivom fungicida na rast rastlin.

Ker je večina čebulic, iz katerih smo izolirali bazalne plošče za tkivne kulture imela potrjeno prisotnost SLV, smo se odločili za eliminacijo virusov s termoterapijo. Za termoterapijo je potrebno odbrati le najvitalnejše in dobro razvite rastline s krepkim koreninskim sistemom. Pred termoterapijo smo z željo po okrepitvi koreninskega sistema osnovnemu gojišču dodali avksine (NAA (10 ml/l)), da bi spodbudili rast korenin. Na ta način bi bile rastline močnejše in so lažje kljubovale visokim temperaturam tekom termoterapije, vendar izboljšanja v koreninjenju nismo zaznali. 12 najvitalnejših odbranih rastlin je bilo termoterapiji izpostavljenih najprej en teden pri 30 °C, da so se privadile višjim temperaturam in niso doživele temperaturnega

šoka do te mere, da bi propadle. Walkey in sod. (1987) so poročali, da so rastline česna, ki so bile iz temperature 20 °C prenesene takoj na termoterapijo (36 °C) večinoma propadle. Po enem tednu smo rastline za 5 tednov izpostavili 37 °C, kar je rastline precej izčrpalo. To je bilo vidno tudi v rasti oz. Rjavenju konic listov (Slika 3). O večjem izpadu rastlin po termoterapiji poročajo tudi Wang in sod. (2020).



Slika 3: Levo vitalna šalotka sorte Pohorka v tkivni kulturi na osnovnem gojišču in desno šalotka po termoterapiji (30 °C za 1 teden in nato 37 °C še za 5 tednov).

Po šestih tednih je sledila izolacija meristemov iz osmih rastlin, ki so preživele termoterapijo, vendar je regeneracija šalotk iz meristemov še v izvajanju. Testiranje na prisotnost virusov bo sledilo po opravljeni termoterapiji, pri rastlinah regeneriranih iz izoliranih meristemov. Za dokončno potrditev odsotnosti virusov po opravljenem čiščenju bomo uporabili občutljivejše molekularne metode.

4 SKLEPI

Na IHPS nam je pri šalotki sorta Pohorka uspelo prenesti na viruse testiran žlahtniteljski material v *in vitro* razmere. Iz bazalne plošče nam je na izbranem gojišču uspelo vzgojiti rastline. S serološkim testiranjem na prisotnost virusov, smo ugotovili 100 % okuženost rastlin s SLV. Medtem ko prisotnosti virusa na testiranih mladih čebulicah nismo zaznali, je bila prisotnost virusa zaznana v zelenih listih po mesecu dni rasti v loncih, kar kaže na to, da se med rastjo viša tudi koncentracija virusa. Zaradi prisotnosti spor glive *Aspergillus niger* na čebulicah in posledično tudi v tkivnih kulturah, smo vzpostavili protokol čiščenja in razkuževanja, ki se bo v prihodnje uporabljal za gojenje šalotke *in vitro*.

Naše delo bomo nadaljevali s postopkom izolacije meristemov pri rastlinah, ki so bile izpostavljene termoterapiji in njihovo regeneracijo. V kolikor bomo našli zdrave rastline, bomo nadaljevali s postopkom množenja iz bazalnih plošč. V nasprotnem primeru pa bomo nadaljevali zdravljenje s kemoterapijo. Za dokončno potrditev odsotnosti virusov po opravljenem čiščenju bomo uporabili molekularni test.

Okužba šalotke s SLV ne predstavlja večje gospodarske škode na posevkih, ob predpostavki, da je šalotka okužena le s tem virusom. V kombinaciji z ostalimi virusi, predvsem virusi iz rodu *Potyvirus* pa lahko pride do sinergističnega delovanja in posledično do velikega izpada pridelka. Z delom smo prispevali k prvemu vedenju o prisotnosti virusov v žlahtniteljskem materialu sorte Pohorka ter vzpostavili sistem prenosa iz *in vivo* v *in vitro* razmere ter vzpostavili sistem ohranjanja rastlin v tkivni kulturi.

ZAHVALA

Delo je bilo opravljeno v okviru EIP projekta z naslovom Vzpostavitev vzdrževalne selekcije čebulnic za pridelavo zdravega semena slovenskih sort česna (*Allium sativa*) in šalotke (*Allium cepa* var. *aggregatum*). Projekt se je izvajal v okviru ukrepa M16 - Sodelovanje iz Programa razvoja podeželja 2014-2020, podukrepa M16.2 - Podpora za pilotne projekte ter za razvoj novih proizvodov, praks, procesov in tehnologij. Tanji Kokalj, Barbari Grubar in Aljoši Bebru se zahvaljujemo za izvedbo laboratorijskih testov za viruse.

5 LITERATURA

- Cafrune E. E., Perotto MC., Conci V. C. 2006. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. *Plant Disease*, 90: 898–904.
- Conci V. C., Canavelli A., Lunello P., Di Rienzo J., Nome S. F., Zumelzu G., Italia R. 2003. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease*, 87: 1411–1415.
- Černe M. 1992. Čebulnice: čebula, česen, por, zimski luk, drobnjak, šalotka. Ljubljana, Kmečki glas: 61 str.
- FURS. 2022. Citirano po: <http://spletni2.furs.gov.si/sorte/Index.htm> (20. 10. 2022)
- Hidayat I. M. 2005. In Vitro Plant Regeneration and Bulbet Formation of Shallots (*Allium ascalonicum* L.) 'Sumenep'. *Acta Hort.*, 688: 251–257.
- Katis N. I., Maliogka V. I., Dovas C. I. 2012. Viruses of the genus *Allium* in the Mediterranean region. *Adv. Virus Res.*, 84: 163–208.
- Lunello P., Di Rienzo J., Conci V. C. 2007: Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Disease*, 91: 153–158.
- Manjunathagowda D. C., Gopal J., Archana R., Asiya K. R. 2017. Virus-Free Seed Production of Garlic (*Allium sativum* L.): Status and Prospects. *Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci.*, 6: 2446–2456.

- Mituti T., Marubayashi J. M., Moura M. F., Krause-Sakate R., Pavan M. A. 2011. First report of shallot latent virus in garlic in Brazil. *Plant Disease*, 95: 227.
- Pauzi Y. S., Lestari S. M., Hidayat S. H. 2018. Variations of *Garlic Common Latent Virus* and *Shallot Latent Virus* Concentration on Shallot and Garlic. 8 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 197.
- Perotto M. C., Cafrune E. E., Conci V.C. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Alexiviruses. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 489–495.
- Sako I. 1989. Occurrence of Garlic latent virus in *Allium* species. *Plant Prot.*, 43: 389–392.
- Smékálová K., Stavělíková H., Dušek K. 2017. Distribution of viruses in the shallot germplasm collection of the Czech Republic – Short Communication. *Hort. Sci.*, 44: 49–52.
- Swamy K. R. M., Veere Gowda R. 2006. Leek and shallot. *Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 3: 365-389.
- Vršček Marn M., Mavrič Pleško I., Ugrinović K., Škof M., Komatar E. 2017a. Vzgoja kakovostnega razmnoževalnega materiala česna sorte 'Ptujski jesenski'. Zbornik predavanj in referatov 13. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo Rimske Toplice, 7.-8. marec 2017.
- Vršček Marn M. in Mavrič Pleško I. 2017. Integrirano varstvo rastlin. Virusi česna. Citirano po: <https://www.ivr.si/skodljivec/virusi-cesna/> (21. 10. 2022)
- Viršček Marn M., Ugrinović K., Škof M. 2017b. Pridobivanje in vzdrževanje zdravega semenskega materiala slovenskih sort česna. 10 str.
- Walkey D. G. A., Webb M. J. W., Bolland C. J., Miller A. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *The Journal of Horticultural Science*, 62: 211-220.
- Wang M., Zhibo H., Blystad D., Wang Q. 2020. Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. *Ann. Appl. Biol.*, 178: 442–449.
- Wang M., Zhibo H., Ma X., Blystad D., Wang Q. 2021. Double-edged effects of the cryogenic technique for virus eradication and preservation in shallot shoot tips. *Plant pathology* 71: 494-504.